

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



29 SEP 2004



(43) 国際公開日
2003年10月9日 (09.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/083478 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/543, 33/545, 33/553

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/03504

(22) 国際出願日: 2003年3月24日 (24.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-101134 2002年4月3日 (03.04.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

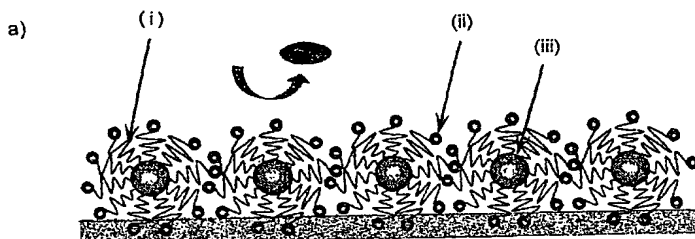
(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 片岡 一則 (KATAOKA, Kazunori) [JP/JP]; 〒165-0031 東京都 中野区 上鷺宮 5-17-22 Tokyo (JP). 長崎 幸夫 (NAGASAKI, Yukio) [JP/JP]; 〒302-0128 茨城県 守谷市 けやき台 3-5-17 Ibaraki (JP). 大塚 英典 (OTSUKA, Hidenori) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県 つくば市 並木 2-11 214-705 Ibaraki (JP). 内田 勝美 (UCHIDA, Katsumi) [JP/JP]; 〒277-0005 千葉県 柏市 柏 2-5-7-301 Chiba (JP). 石井 武彦 (ISHII, Takehiko) [JP/JP]; 〒340-0211 埼玉県 北葛飾郡 鷺宮町 上内 1-2-1-1 Saitama (JP). 鈴木 祐子 (SUZUKI, Yuko) [JP/JP]; 〒989-6151 宮城県 古川市 城西 1-8-25 Miyagi (JP). 秋山 好嗣 (AKIYAMA, Yoshitsugu) [JP/JP]; 〒114-0014 東京都 北区 田端 1-10-21 コーポ竹 201 Tokyo (JP). 高江 誓詞 (TAKAE, Seiji) [JP/JP]; 〒206-0033 東京都 多摩市 落合 4丁目4番 2-404 Tokyo (JP).

[続葉有]

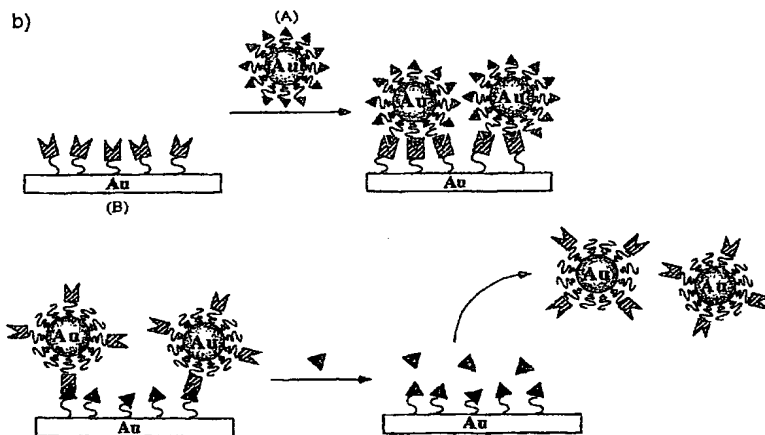
(54) Title: BIOCHIP SENSOR SURFACE CARRYING POLYETHYLENE GLYCOLATED NANOPARTICLES

(54) 発明の名称: ポリエチレングリコール化ナノ粒子を担持するバイオセンサーチップ表面



(57) Abstract: It is intended to provide a highly sensitive bioassay sensor system wherein nonspecific adsorption of impurities such as proteins in a biological sample is prevented. In this system, use is made in amplification of polyethylene particles having a metal and a semiconductor common to sensor materials enclosed therein.

(57) 要約: 生物学的試料における夾雑物、例えば、タンパク質等の非特異的吸着を抑制した高感度バイオアッセイセンサー系が提供される。センサー材料と共通する金属、半導体を内包するポリエチレン化粒子を増幅に用いる。





(74) 代理人: 小田島 平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.);
〒107-0052 東京都 港区 赤坂 1 丁目 9 番 1 5 号 日本
自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(81) 指定国 (国内): CA, CN, KR, US.

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

明 細 書

ポリエチレングリコール化ナノ粒子を担持するバイオセンサー
5 チップ表面

技術分野

本発明は、バイオアッセイの技術分野に関し、より具体的には、生物
学的流体等に含まれる被検体以外の夾雑物による非特異吸着もしくは結
10 合を低減もしくは防止するか、被検体の検出感度を高めることのできる
バイオセンサー系、ならびに該バイオセンサー系を使用するアッセイ方
法に関する。

背景技術

生物学的試料中に存在する被検体を検出する方法として、多種多様な
15 検出様式をもつバイオセンサーが提案されている。そのようなバイオセ
ンサーの中で、表面プラズモン共鳴（以下、SPRともいう）を利用す
るセンサーは、金属薄膜の表面およびその近傍における屈折率変化に対
して敏感である（例えば、A. Szabo et al., Curr. Opin. Strnct. Bio
1. 5（1995）699－705参照）。SPRは、表面と複雑な生
20 物学的溶液との間で生じる過程のインサイチュ（in situ）での観察が
可能であり、そして例えば標識を使用することなくリアルタイムに被検
体からのデータが入手できるので、動力学的および熱力学的なパラメー
ターを取得するのに適していることから注目を集めているセンサーの一
つである。

このような表面をもつバイオセンサーチップの典型的なものとしては、アマシャム ファルマシア バイオテク（株）から入手できるB I A C O R E（商標）がある。このB I A C O R Eは、末端がカルボキシル化されたデキストランのマトリックスが半透明の状態で金の薄膜上に固定されている。より具体的には、式H S - R - Y（Rは10原子を越える鎖の長さを有し、ヘテロ原子で中断されていてもよい炭化水素鎖であり、Yはリガンド又は生適合性多孔質マトリックスを共有結合させるための活性基である）で表される有機分子を用いて、そのチオール（またはメルカプト）基を介して金、銀などの自由電子金属の薄膜表面へ結合させて密に詰め込まれた単層で該表面を被覆し、次いで、生適合性多孔質マトリックスとして、リガンドを結合させるための官能基を有していてもよいアガロース、デキストラン、ポリエチレングリコール等からなるヒドロゲルを共有結合した表面を有するバイオセンサーチップが提供されている（例えば、米国特許第5763191号参照。）。このようなバイオセンサーチップ上での生物学的物質、例えば、タンパク質の検出に際しては、S P R シグナルの一定の増幅および非特異吸着の防止が達成される。

また、主として、目的とする被検体タンパク質等の測定に際して、生物学的流体中等に存在する夾雑物のセンサーチップ表面への非特異吸着を防止するものとして、支持体上へ硫黄原子（メルカプト基の）を介して結合したスペーサー分子（炭素原子数1～30のアルキレン鎖）に親水性リンカー部（鎖長4から15原子の直鎖分子）と固相反応物質（ビオチン誘導体残基）が順に共有結合した表面を有するセンサーチップも提供されている（例えば、米国特許第3071823号参照。）。また、

H S - スペーサー分子（炭素原子数 11 のアルキレン鎖）- 親水性リンカー（エチレンオキシド単位 3 個または 6 個からなる鎖）- をベースとする化合物を用い、メルカプト基を介して金表面に自己集成した単層を有するセンサーチップも提供されている（例えば、Roberts et al., J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 6548-6555 参照。）。さらに、エチレンオキシド単位が 5-10,000 の範囲にあるヘテロテレケリックポリマーを担持する表面をもつセンサーチップを提案されている（WO 01/86301 A1 参照。）。

上述のとおり、このような表面を有するセンサーチップは SPR シグナルの一定の増幅も達成される。しかしながら、さらなる検出感度を高め得るバイオセンサー系として、コロイド金（Au）を金薄膜表面（これらの表面には、上記の各文献に記載されているような、デキストラン層、ポリエチレングリコール層を担持しない。）を有するセンサーチップと組み合わせて使用するものも多数提供されている。一般に、かような系では、コロイド金を使用しない系に比べて、プラズモン角の大きなシフト、広幅なプラズモン共鳴および最低反射率の著しい増大がもたらされること等が、利点として挙げられている（例えば、L. A. Lyon et al., Anal. Chem. 1998, 70, 5177-5183、特に、5177 頁の序の項；J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 9071-9077；E. Hutter et al., J. Phys. Chem. B 2001, 105, 11159-11168；特開 2002-267669 号公報、特開 2000-55920 号公報、参照。）。これらの金コロイドまたは金ナノ粒子を SPR の増幅もしくは増強に用いる系のセンサーチップ表面は、共通して、金薄膜上をアルカンチオール（例えば、3-メルカプトプロ

ピオン酸もしくは3-メルカプトエチルアミン)等で修飾し、次いでビ
オチンまたはアビジンもしくはストレプトアビジン、抗体、等を共有結
合させている。金コロイドまたは金ナノ粒子は、上記のようなアルカン
チオール類を用いるか、または用いることなく、タンパク質を結合(化
5 学的吸着を含む。)して、ビオチン-ストレプトアビジン、抗原-抗体
のごとき、生物学的な特異的結合対を形成することにより、上記のセン
サーチップ表面に結合させている。また、E. Hutter et al., では、金
または銀の支持体(センサーチップ)上に2-アミノエタントチオール(A
E T)または1,6-ヘキサンジチオール(H D T)を用いて、直接、
10 金ナノ粒子を固定すると、A u / A E T / A u系は増強されたS P R感
度を示すが、A u / H D T / A u系は、金ナノ粒子の増幅効果が相当低
くなることが示唆されている(その第11159頁、序の項参照。)
またさらに、上記のような金ナノ粒子を用いてガラス製センサーチップ
上に自己集成単層を形成すると、可視-UVスペクトロフォトメーター
15 で、チップ表面上で生物分子間の相互作用がリアルタイムに追跡できる
ことも知られている(例えば、N. Nath et al., Anal. Chem. 2002,
74, 504-509参照。)

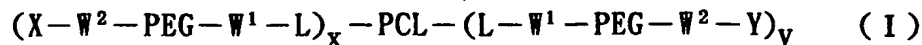
なお、上記のようなバイオセンサー系を構成するものでないが、バイ
オアッセイにおける標識として用いる金属粒子の表面をポリエチレング
20 リコール(またはポリエチレンオキシドともいう)のような水溶性で、
かつ、水性媒体中でモビリティの高いポリマー鎖で修飾し、該粒子の分
散安定性を改善する方法(W. Pwulfine et al., J. Am. Chem. Soc.
120(48), 12696-12697(1998))や、金属粒子
表面に結合したポリエチレングリコールの該結合部位の他の末端に機能

- 性化合物の残基を有するポリエチレングリコール化〔以下、PEG修飾 (PEG modified) ともいう。〕金属粒子、半導体粒子または磁性粒子も水性媒体中で分散安定性を示すものとして知られている (Otsuka et al., J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 8226-8230) ; 特開 2001-200050 号公報 ; 特開 2002-80903 号公報、参照。)。また、半導体ナノ粒子をポリマー (例えば、ジアセチレン、スチレン等で取り囲むようにした粒子を生物学的な物質を検出するためのプローブとして用いることも提案されている (例えば、米国特許第 6207392 号明細書参照。))。
- 10 上述の金ナノ粒子を SPR の感度の向上に用いる系では、金ナノ粒子とバイオセンサーチップの金薄膜表面との間の距離または粒子と表面との結合様式によって増感効果が異なることが示唆されている (例えば、N. Nath et al., 参照。)。したがって、上述のような金ナノ粒子とバイオセンサーチップを用いる系を、米国特許第 5763191 号に記載
- 15 されている系へ適用しても、感度が低下するか、または夾雑物の非特異吸着の防止ができない、可能性がある。

発明の開示

- 本発明者らは、BIA CORE[®] のセンサーチップや、ポリエチレングリコール修飾表面をもつセンサーチップと、主として水性媒体中での
- 20 分散安定性を改善するものとして提供されているポリエチレングリコール修飾金属粒子もしくは半導体粒子を組み合わせると、対応するセンサーチップによるバイオアッセイの感度を高め得るとともに、夾雑物による非特異吸着を防止または抑制できることを見出した。本発明は、かような知見に基づき、完成されたものである。

本発明によれば、(A) 構造式 I :



5 式中、PCLは自由電子金属微粒子、金属酸化物微粒子または半導体微粒子を表し、

Xはバイオセンサーチップ表面に結合することのできる官能基もしくは機能性部分を表し、

YはC₁-C₈アルキル基、Xの官能基もしくは機能性部分を形成するのに使用できる保護されていてもよい官能基およびXと同一もしくは異なる機能性部分からなる群より選ばれる1種以上の基もしくは部分を表し、
10 LはPCLに結合する基もしくは結合部分を表し、

W¹およびW²は、単結合または同一もしくは異なる連結基を表し、

PEGは、エチレンオキシド単位：(—CH₂CH₂O—)_n (ここで、nは5-10,000のいずれかの整数である。)を表し、

15 ここで、(X-W²-PEG-W¹-L)_xと(L-W¹-PEG-W²-Y)_yにおけるW²-PEG-W¹-Lは同一もしくは異なることができ、そして

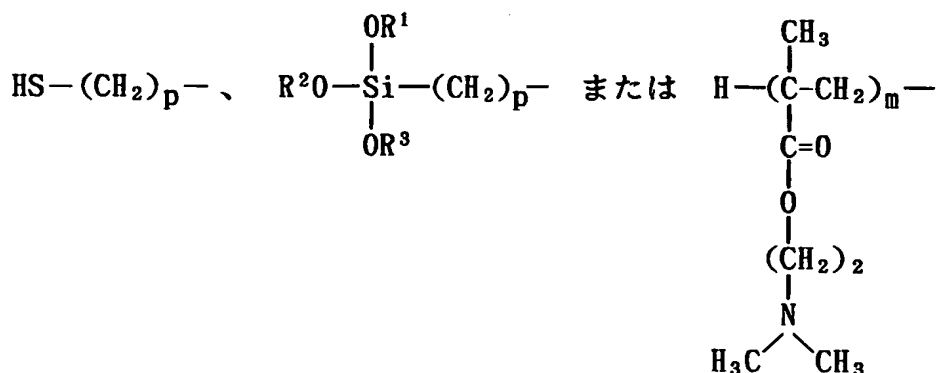
xおよびyは、独立して1以上の整数であり、かつ、一緒になってPEG鎖が水性媒体中でPCLの表面を被覆するのに十分な整数を表す
20 のポリエチレングリコール修飾ナノ粒子と、

(B) (A)の粒子がXを介して結合することができ、かつガラスなどの誘電体またはPCLの材料に担当する材料からなる表面を有するバイオセンサーチップとのセットを含んでなるバイオアッセイに用いるためのバイオセンサー系が提供される。

別の態様の本発明として、前記の構造式 I における X が生物学的な特異的結合対を形成する一員の残基であり、Y が生物学的な特異的結合対を形成する残基以外の基であり、

L は、式

5



10

(ここで、p は 2 - 12 のいずれかの整数を表し、R¹、R²および R³ は独立して C₁-C₆アルキル基を表し、そして m は 2 ~ 100 のいずれかの整数を表す) の基を表し、そして x + y は PCL の表面 1 nm² 当たり 0.1 - 0.5、好ましくは 0.25 - 0.40 に相当するいずれかの数であり、(x / x + y) × 100 が 1 - 99、好ましくは 20 - 65 の整数であり、そして PCL の横断面の平均寸法が 1 - 500 nm、好ましくは 5 - 500 nm であるポリエチレングリコール修飾ナノ粒子も提供される。

20 さらに別の態様の発明として、(a) 前記ポリエチレングリコール修飾ナノ粒子を用意し、

(b) 該ナノ粒子の PCL の材料に対応する薄膜表面を有し、該ナノ粒子の X の生物学的な特異的結合対の一員に対する他の一員が直接または少なくとも C₁-C₆アルキレン基もしくは (-CH₂CH₂O-)_n (こ

ここで、 n は5-10,000のいずれかの整数である)を介して担持された表面を有するバイオセンサーチップを用意し、

(c) (a)の粒子および(b)のバイオセンサーチップを該生物学的な特異的結合を形成しうる構成員のいずれかの一員を被検体として

5 含むことが疑われる生物学的流体と接触させ、

(d) 被検体の競合作用による(a)の粒子と(b)のバイオセンサーチップ表面との結合の程度の変化を決定し、

(e) 該変化を生物学的流体中の被検体濃度の指標とする、
ことを含んでなる生物学的流体中の被検体の検出方法も、提供される。

10 本発明に従う、(A)の粒子と(B)のバイオセンサーチップとのセットは、それらが結合(共有結合または非共有結合(例えば、生物学的な特異的結合にみられる疎水結合、イオン結合、化学吸着、等))を形成すると、例えば共鳴ラマン散乱を表面増感効果により増大させる。

特に、自由電子金属微粒子にあっては表面プラズモン共鳴シグナルの
15 著しい変化(プラズモン角の大きなシフト、広幅なプラズモン共鳴および最低反射率の増大)がもたらされる。驚くべきことに、このような変化は、バイオセンサーチップ上にかなりの厚さをもつデキストラン層を担持するB I A C O R E (商標)センサーチップと該(A)の粒子が結合した場合にも認められる。

20 さらに、本発明に従う、(A)の粒子で被覆された(B)のバイオセンサーチップ表面は、仮に該チップ表面が上記のようなデキストラン層やポリエチレングリコール修飾されていなくても、例えば、生物学的流体中に存在するタンパク質等の非特異的吸着を有意に抑制できる。

図面の簡単な説明

図 1 は本発明に従う P E G 修飾金ナノ粒子とセンサーチップ表面との
関係を示す概念図である。a) は金属面上に P E G 修飾金ナノ粒子が固
定された高感度システムの略図であり、(i) は非特異的吸着を抑制す
る P E G 鎖を表し、(ii) リガンド分子を表し、そして (iii) は S P R
5 応答を強化する金粒子を表す。b) は、競合アッセイ系を構成する略図
である。

図 2 は 1 a c 6 5 とレクチンの特異的結合を確認するために行った実
験結果のセンサーグラムである。

図 3 は P E G 修飾金ナノ粒子表面上のラクトース密度とレクチン固定
10 化表面とのレスポンスの関係を示すグラフである。

図 4 はラクトース-レクチンを介して結合した P E G 修飾金ナノ粒子
とセンサーチップとのガラクトースの競合による解離状態を示すセンサ
ーグラムである。

図 5 は非結合末端にアミノ基を有する P E G 修飾金ナノ粒子のゼータ
15 電位の測定結果を示すグラフ (●印の曲線) と非結合末端アセタール化
ホルミル基を有する金ナノ粒子の同様な測定結果を示すグラフ (■印の
曲線) である。

図 6 は非結合末端にビオチン残基を有する P E G 修飾金ナノ粒子への
タンパク質の担持量を測定した結果を示すグラフである。

20 図 7 は、金チップ表面に非結合末端にアミノ基を有する P E G 修飾金
ナノ粒子を直接吸着させた表面における各種タンパク質の吸着性を示す
グラフである。

図 8 は、図 7 で用いた金ナノ粒子を S P D P を利用して金チップ表面
に結合させた表面のタンパク質の吸着性を示すグラフである。

発明の具体的な記述

本発明に従うバイオセンサー系の特に注視している使用は、表面プラズモン共鳴（SPR）を利用したバイオアッセイ（生物分子のアッセイ）に向けられているが、本発明にいうアッセイはSPR以外のトレースで
5 きるシグナル、放射能、各種電磁波の接触角、沈降、紫外分光、ラマン散乱、等の変化を利用するものも包含する。本発明にいうバイオアッセイが検出対象とする生物分子は、所謂、生物学的な特異的結合対（例えば、生物分子どうしが疎水結合、イオン結合、等によって形成する。）、より具体的には非共有結合対を形成する構成員、リガントとレセプター、
10 例えば、抗原もしくはハプテンと抗体、糖とレクチン、基質と酵素、ホルモンとその受容体、オリゴヌクレオチドとそれの相補鎖、ビオチンとアビジンもしくはストレプトアビジン類のごとき結合対を形成するいずれかの構成員であることができるが、これらに限定されない。

本発明にいう「バイオセンサー系」とは、上記のごときアッセイを行う
15 うのに用いることのできる各要素またはそれらの集成体もしくは組み合わせ物を意味する。さらに、本明細書では、「微粒子」および「ナノ粒子」は、互換可能に使用されており、特記されない限り、ナノオーダーのものに限定されることなく、サブナノまたは数マイクロメートルのものまで包含するものとして用いられている。

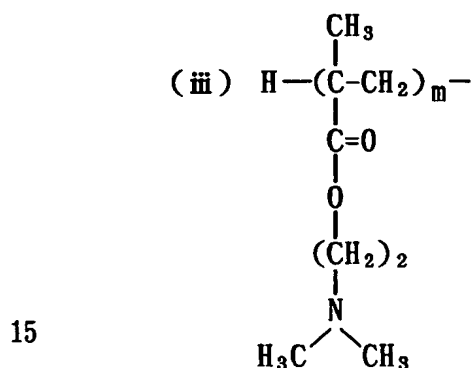
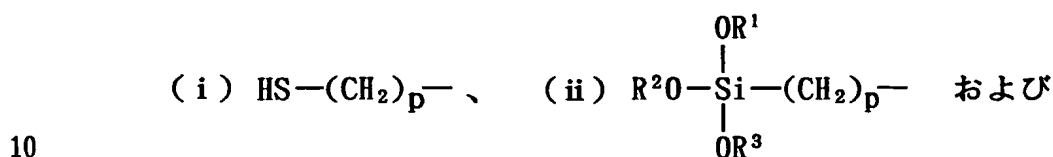
20 以下、本発明の構成について詳述する。

(A) 構造式 I で表されるPEG修飾ナノ粒子に関して

PCLは、自由電子金属（例えば、金、銀、白金、アルミニウム、銅、等）、半導体（例えば、CdS、ZnS、CdSe、InAs等）および金属酸化物（例えば、TiO₂、Cr₂O₃等）からなる群より選ばれ

る材料製の微粒子であることができる。限定されるものでないが、1～500nmの平均横断面の寸法を有するものが都合よく利用できる。

Lは、上記粒子表面に結合（化学結合もしくは化学吸着、金属酸化物にあっては、水酸化により生じる表面-OH基を介する共有結合等）し
 5 うる基もしくは部分を介する結合であり、本発明の目的に沿うものであれば、いかなるものであってもよい。しかし、好ましくは、次式（i）、（ii）および（iii）

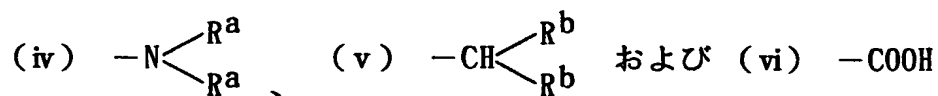


からなる群より選ばれる基を介する結合を表す（ここで、pは2～12のいずれかの整数を表し、 R^1 、 R^2 および R^3 は独立して C_1-C_6 アルキル基を表し、そしてmは2～500、好ましくは5～100のいずれ
 20 かの整数を表す。）。かような結合は、例えば（i）および（iii）の基または部分（もしくはセグメント）であるときは、上記の粒子表面との間で形成されるものであることができ、また、（ii）の基または部分であるときは、水酸化された金属酸化物表面の-OHとシラノール基との間の脱アルコール反応を伴って形成される結合であることもできる。

PEGは、エチレンオキシド単位： $(-CH_2CH_2O-)_n$ （ここで、 n は5～10,000、好ましくは10～10,000、より好ましくは20～2500のいずれかの整数である。）である。

- Xはバイオセンサーチップ表面に結合することのできる官能基もしくは
- 5 は機能性部分を表す。官能基もしくは機能性部分は、上記のIを形成するものとして例示した式(i)、(ii)および(iii)で示される基もしくは部分であることもでき、さらに、上記の生物学的な特異的結合対を形成する一構成員の残基、ならびにバイオアッセイに影響を及ぼさないタンパク質の残基であることもできる。
- 10 該特異的結合対の構成員のうち、一般に分子量の小さいもの、例えば、ハプテン、糖、基質、ホルモン、オリゴヌクレオチド、ビオチン由来の残基が好ましい。

- Yは C_1-C_6 アルキル基、Xについて定義した基もしくは機能性部分またはその保護された形態にある部分またはXとは別の基もしくは機能
- 15 性部分またはその保護された形態にある基もしくは部分であることができる。Xとは別の基もしくは部分の代表的なものとしては、次式(iv)、(v)および(vi)



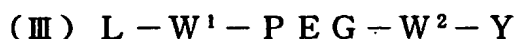
20

（ここで、 R^a は独立して、水素原子または C_1-C_6 アルキルを表し、 R^b は独立して C_1-C_6 アルキルオキシまたは2つの R^b が一緒になってオキシもしくは C_1-C_6 アルキルで置換されていてもよいエチレン基を形成する原子団を表す。）で表される基から選ばれるものが挙げられる。

Yの好ましいものとしては、上記式 (iv)、(v) および (vi)、並びにXについて定義した、式 (i) および C_1-C_6 アルキル基からなる群より選ばれる基もしくは部分を挙げることができる。

- 5 W^1 および W^2 は独立して、連結基、例えば単結合、 C_1-C_6 アルキレン、 $-COO-$ (酸素原子を介してエチレンオキシド単位のメチレン基に結合する)、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-COO-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-O-$ および $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-S-$ からなる群より選ばれる基であることができる。

- 10 以上の各基、部分および/またはセグメントから構成される式 (II) および (III) :



- で表されるポリマーは、上記XおよびYの定義から理解できるように同一であることができるが、異なっていることが好ましい。また、これら
- 15 の式中の $W^2-PEG-W^1-L$ は同一もしくは異なることができる。式 (II) および式 (III) で表されるポリマーは、それぞれ独立して1以上の整数個 (それぞれ、x および y の整数に対応する。) が単一 PCL 表面上に結合する。これらの $x+y$ は、PCL 表面を PEG 鎖が被覆するのに十分な整数で存在する。この数は、本発明に従う、ポリエチレング
- 20 リコール化粒子表面 (かような粒子でセンサーチップ表面が被覆された場合にはその被覆表面) に水性媒体中で非特異的なタンパク質等の吸着が抑制できる数であろう。抑制の程度については、後述する実施例を参考にできる。なお、非特異的なタンパク質等の吸着とは、例えば、Xが生物学的な特異的結合対を形成しうる一員、例えば、抗原である場合に、

それに対する抗体が結合するような特異的結合を介するもの以外の吸着を意味する。限定されるものでないが、 $x + y$ の具体的な数は、PCL表面 1 nm^2 当たり $0.1 - 0.5$ 、好ましくは $0.25 - 0.40$ となる数に相当するいずれかの数である。 x と y の割合は、上述のとおり、式

5 (Ⅱ) と式 (Ⅲ) で表されるポリマーが同一であることができるように、任意であることができる。しかし、後述するような、バイオセンサー表面と該PEG修飾粒子との生物学的な特異的結合に対する被検体の競合作用を利用するようなアッセイにおいては、 x と y の総数当たりの x の割合は、 $1 - 99$ 、好ましくは $20 - 65$ であることができる。このよ
10 うな割合で式 (Ⅱ) (Xが生物学的な特異的結合対を形成する一員である。) のポリマーと式 (Ⅲ) (YがXと異なり、Xと結合しない基もしくは部分である。) のポリマーをPCL上に配置できる。このような態様の粒子は、迅速かつ、高感度のアッセイを行うことに役立つ。

以上のポリエチレングリコール化粒子の典型的なものは、上述の Otsuka et al., J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 8226-8230、特開2001-200050号公報、特開2002-80903号公報に記載されており、また、これらの記載に準じて製造できる。また、該粒子を形成するために利用できる。特に、ヘテロテレケリックポリマーは、本発明の一部が提案した、WO 96/32434、WO 96
20 /33233、WO 97/06202に記載するブロックコポリマーの α 、 ω -末端の機能化を参考すれば、当業者にとって容易に製造できるであろう。

なお、上記の定義中で用いた、 $C_1 - C_6$ アルキル、 $C_1 - C_6$ アルキルオキシ、 $C_1 - C_6$ アルキレンが、異なる基または部分について用いられ

ている場合であっても、それらは共通の意味を有する。例えば、 C_1-C_6 アルキルは、メチル、エチル、 n -プロピル、 i so-プロピル、 n -ブチル、 sec -ブチル、 n -ヘキシル等を表し、 C_1-C_6 アルキルオキシとしては、上記 C_1-C_6 アルキルのそれぞれの対応するアルキルオキシが例示される。また、 C_1-C_6 -アルキレンは、メチレン、エチレン、プロピレン、1,3-トリメチレン、1,6-ヘキサメチレン等である。

(B) バイオセンサーチップに関して

バイオセンサーチップは、その表面が上記 (A) で詳述した PEG 修飾ナノ粒子の X 基もしくは部分と結合でき、バイオアッセイに利用できるものであれば、その形状、寸法に制限はない。しかし、好ましくは、その表面はセットで用いられる PCL を形成する材料と同一もしくは同一のクラス（例えば、自由電子金属の場合、金と金、金と銀；半導体の場合、CdS と CdS、CdS と InAs）となるように選ぶのが、

(A) の粒子と該センサーチップから得られる上述のごときシグナルを増強するのに好ましい。しかし、可視-UV スペクトロメーターを用いてシグナルを検出する場合には、これらの光を透過するクリスタルまたはガラスであることもできる。該表面は、通常、対応する材料を蒸着させた薄膜であることができる。

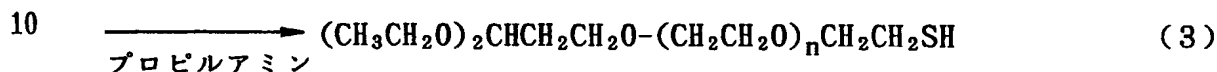
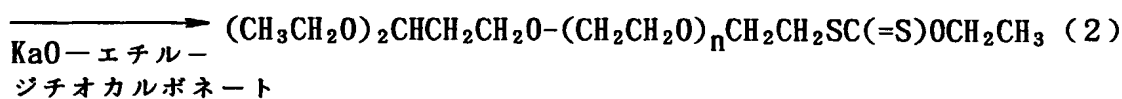
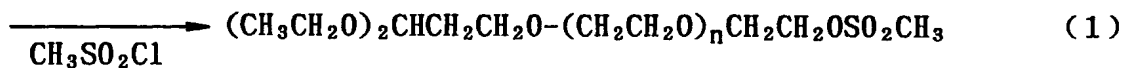
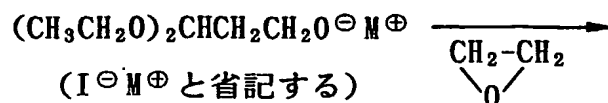
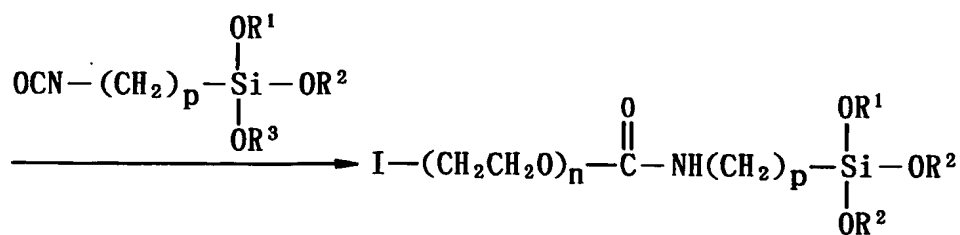
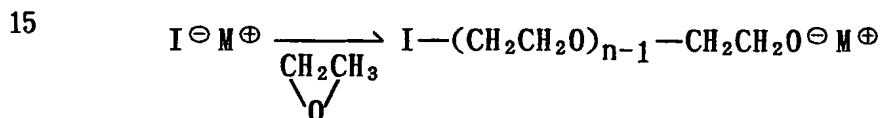
このような表面は、上記 (A) の粒子における X の基もしくは部分との結合形成が促進できるように修飾されているか、また、X がタンパク質である場合には、材料それら自体であることができる。かような修飾は、式 (I) における L について記載したような、PCL との結合性を示す基もしくは部分を少なくとも一片末端にもつ有機化合物で行うこと

ができる。例えば、金、銀、半導体から形成された表面をもつチップでは、アルカンチオール（例えば、3-メルカプトプロピオン酸もしくは2-メルカプトアミン）を用いて表面を修飾した後、遊離のカルボキシル基もしくはアミノ基を利用して、生物学的な特異的結合対を形成する一員（Xの一員に対するもの）を共有結合して好ましい表面を完成することができる。このような表面をもつバイオセンサーチップとしては、上述の L. A. Lyon et al., E. Hutter et al., 特開2002-267669号公報、特開2000-55920号公報に記載されたものが例示できる。

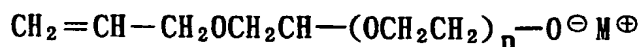
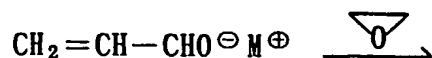
10 また、表面にデキストラン層を担持したBIA CORE（商標）センサーチップ、ポリ（オキシエチレン）鎖を中間に有するヘテロテレケリックポリマーで被覆された表面をもつセンサーチップ（例えば、WO 01/86301 A1参照）をもつものも、本発明で利用できる。

その他のセンサーチップも、当業者であれば、以上の従来技術を参照
15 することにより作製できるであろう。

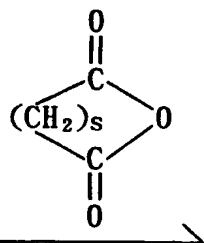
以上のPCL表面およびセンサーチップ表面を修飾するのに用いることのできる典型的なヘテロテレケリックポリマーは、下記の反応スキームに従って製造できる。

反応スキーム I :反応スキーム II - a :

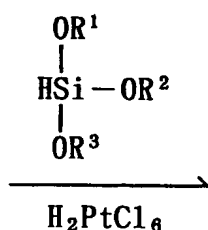
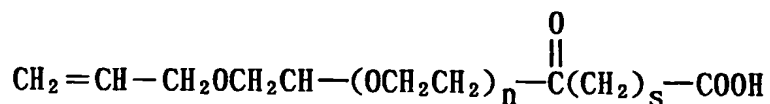
20

反応スキーム II - b :

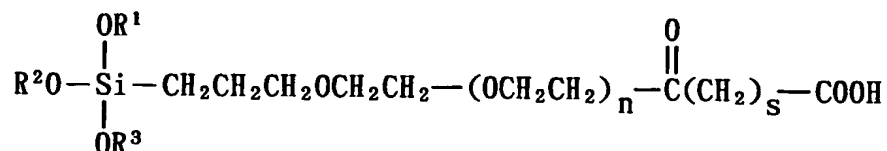
5



10



15

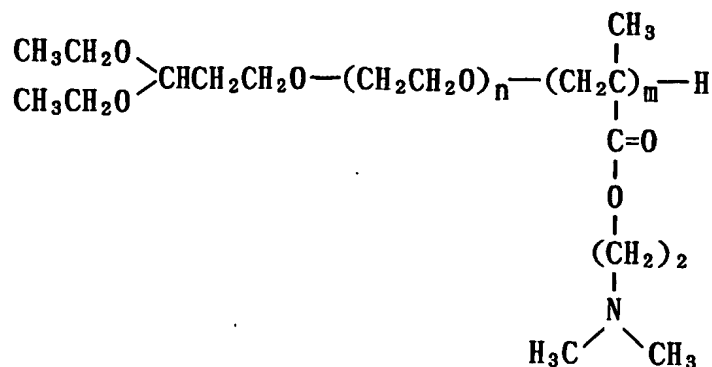


(以上の各式中の略号は、Mはカリウム、ナトリウム、リチウムを表す。)

20

以上のリビング重合工程は、それ自体公知の反応条件の下で実施できる（例えば、上記のWO 96/32434、WO 97/06202、等を参照されたい。）。その他は、後述する実施例に従い、または記載されている条件を改変して実施できる。

また、式



5

10

は、本発明者らの一部による Kataoka et al., *Macromolecules*, 1999, 32, 6892-6894 に記載の方法に従って得ることができる。PEG Mw=5000 g/mol、PAMA (ポリ [(2-N, N-ジメチルアミノ) エチルメタクリレート]) の重合度 $m=68$) を後述する PEG 修飾微粒子の作成に用いる。

15

20

これらのポリマーを用いる PCL の PEG 修飾について、簡単に述べると、構造式 I における PCL を構成する自由電子金属微粒子、金属酸化物微粒子または半導体微粒子は、それぞれ、市販品を利用するか、それぞれ相当するコロイドを形成することにより得た微粒子を利用することができる。また、本発明に従う PEG 修飾ナノ粒子は、例えば、それぞれ相当する微粒子 (例えば、0.5 nm ~ 1 μm、好ましくは 1 nm ~ 200 nm の平均粒径) を形成する工程中に上述の前駆体ポリマーを共存させて形成することにより、前駆体ポリマーが微粒子表面に結合した、構造式 I の表面またはその前駆表面を作成することもできる。

(A) の粒子と (B) のセンサーチップのセットに関して

(B) のセンサーチップ表面が B I A C O R E (商標) のようなデキストラン層をもつものまたは WO 01/86301 A1 に記載されているようにポリ (エチレンオキシド) 鎖を中間に有するポリマーで修

飾されたもの以外は、被検体を含むことが疑われる試料液と接触する表面が（A）の粒子で実質的に被覆されるように、（A）の粒子と（B）のセンサーチップは使用され、特に、これらは結合した状態で使用される。こうして、（A）の粒子が（B）のセンサーチップ表面を被覆した形態にある表面は、（A）の粒子表面上の式（Ⅱ）および式（Ⅲ）で表されるポリマーの作用により、表面へのタンパク質等の非特異的吸着を有意に抑制できる。勿論のこと、粒子による各種シグナルの増幅効果も得られる。

また、（A）の粒子におけるXが生物学的な特異的結合対を形成する一員であり、（B）のセンサーチップ表面上に、該一員に対する他の一員が存在する場合には、アッセイの概念について略図的に示す図1に示すような態様で、（A）の粒子と（B）のセンサーチップとのセットを使用できる。図中の三角印は、例えば、糖、ビオチン、抗原もしくはハプテン、ホルモン、オリゴヌクレオチド等を表し、該三角が嵌合する印は、それぞれ、レクチン、アビジンもしくはストレプトアビジン、抗体、受容体タンパク質、相補性オリゴヌクレオチドもしくは該ヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチド、等を表す。また、これらの印に結合する波線はポリ（エチレンオキシド）セグメントであることができる。

このような概念図で表されるバイオアッセイ方法も本発明の一態様である。

一般的には、（a） 上記に従って製造されうる（A）の粒子を用意し、

（b） 該ナノ粒子のPCLの材料に対応する薄膜表面を有し、該ナノ粒子のXの生物学的な特異的結合対の一員に対する他の一員が直接ま

たは少なくとも C_1-C_6 アルキレン基もしくは $(-CH_2CH_2O-)_n$
(ここで、 n は 5-10,000 のいずれかの整数である) を介して担
持され表面を有するバイオセンサーチップを用意し、

5 (c) (a) の粒子および (b) のバイオセンサーチップを該生物
学的な特異的結合を形成しうる構成員のいずれかの一員を被検体として
含むことが疑われる生物学的流体と接触させ、

(d) 被検体の競合作用による (a) の粒子と (b) のバイオセン
サーチップ表面との結合の程度の変化を決定し、

(e) 該変化を生物学的流体中の被検体濃度の指標とする、
10 ことを含んでなる生物学的流体中の被検体の検出方法、が提供される。
上記の段階 (d) における、(a) の粒子と (b) のセンサーチップと
の結合の程度の変化は表面プラズモン共鳴スペクトルの変化、例えばプ
ラズモン角のシフト、最低反射率の増大、であることが好ましい。

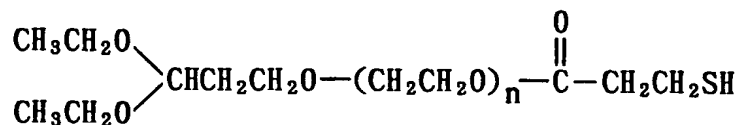
このようなアッセイ方法は、生物学的な特異的結合対を形成する一員
15 (被検体) を含むことが疑われる水性液体試料のいかなるものにも、理
論上、適用できるが、特に、生物学的流体、例えば、血清、血漿、尿、
唾液、等、またはこれらの濃縮もしくは希釈液に適用することを意図し
ている。

かような方法によれば、迅速かつ高感度のアッセイができる。

20 以下、具体例を挙げてさらに本発明を具体的に説明するが、本発明は
これらに限定されない。

製造例 1 : PEG 修飾金微粒子の製造法 (その 1) :

使用ポリマー : Acetal-PEG-SH ($M_n = 5000$)



Acetal-PEG-SH : HAuCl₄ = 1 / 6 : 1 (モル比) の比で
 5 混合した水溶液に HAuCl₄ に対して 10 倍モル量の NaBH₄ を添加
 し、還元法により金コロイドを調整した。末端アセタール基を pH 2 塩
 酸で処理しアルデヒド基に返還後、p-アミノフェニル-β-D-ラク
 トピラノシドと反応し、ラクトース-PEG-SH で修飾した金コロイ
 ド水溶液 (平均粒径 : 8.7 nm) を得た。

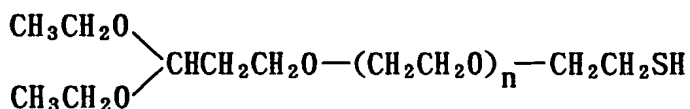
10 なお、アセタール-PEG-SH は、下記のとおりに製造した。

アルゴン置換した受器中に蒸留テトラヒドロフラン (THF) 20 m
 1 と開始剤 3,3-ジエトキシ-1-プロパノール 0.2 mmol (0.
 032 ml) を加え、さらに当量のカリウムナフタレンを加えて 15 分
 15 攪拌することでメタル化を行った。その後、エチレンオキシド 22.7
 mmol (1.135 ml) を加え、室温で 2 日間攪拌し重合させた。
 停止剤として N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオ) プロピ
 オネート (SPDP) 0.4 mmol (0.125 g) を少量の蒸留 TH
 F に溶解させ、この溶液に対し前記の重合反応溶液を等圧滴下漏斗にて
 氷冷下で滴下した。一晚攪拌して停止反応を行った後に、飽和食塩水洗
 20 浄・クロロホルム抽出、エーテル再沈、ベンゼン凍結乾燥を経て、ポリ
 マーを回収した。回収したポリマーは ¹H-NMR にて構造を確認し、
 末端に導入された SPDP 残基の量は、2-メルカプトエタノールと反
 応させることによって遊離した 2-チオピリドンの UV 吸収によっても
 確認した。

PEG-SS-Py 2.0×10^{-2} mmol (100 mg) を蒸留水 4 ml に溶解させ、さらに 5 倍 mol 量のジチオトレイトール 0.1 mmol (15.42 mg) を加え、室温で 30 分攪拌した。反応後、飽和食塩水洗浄・クロロホルム抽出・エーテル再沈を経てポリマー（以下、PEG 5000 と略記する）を回収した。回収したポリマーは $^1\text{H-NMR}$ によって構造を確認し、さらに 2-ピリジルジスルフィド（2-PDS）との反応により、末端 SH 基の定量を行った。

製造例 2：PEG 修飾金微粒子の製造法（その 2）：

使用ポリマー：Acetal-PEG-SH ($M_n = 3200$)



(1) 使用ポリマーの製造

反応スキーム I に従い、開始剤に 3,3-ジエトキシー-1-プロパノール、停止剤にメチルスルフォニルクロライドを用いてアセタール基とメチルスルホニル基を有するヘテロ二官能性 PEG をアニオン重合により合成した。さらに、テトラヒドロフラン (THF) 中でカリウムオルトエチルジチオカルボネートと室温で 3 時間反応させることによって、メチルスルホニル基をエチルジチオカルボネート基に転化したポリマーを得た。

その後、同じく THF 中でプロピルアミンとの反応によって上式で示される α -末端にメルカプト基を有するヘテロ二官能性 PEG (Acetal-PEG-SH) を得た。

(2) 金粒子の PEG 修飾

Acetal-PEO-SH ($M_n = 3200$) とアセタール-PEO-OH (比較例) ($M_n = 3000$) を、それぞれポリマーと金粒子とのモル比が $5.0 \times 10^6 : 1$ になるように測りとり純水 2.0 mL に溶解させた。そして、NaOH 溶液にて pH 6.5 に調製し、金コロイド 1.0 mL ($2.58 \times 10^{-13} \text{ mol}$ 、pH 6.5) を加え室温で 3 時間激しく攪拌させた。次いで、遠心分離 [42,000 g (g は重力加速度)、30 分] 後、溶液を取り除き、残渣に THF 3 mL を加えて超音波をかけて再分散させた。これらのサンプルについて UV を用いて特性解析を行った。

このポリマーを用いた金粒子の調製においては、遠心分離後、THF 溶液に再分散させたときの UV-vis スペクトルから、未修飾の金粒子の UV スペクトルは、粒子の凝集に基づく 600 nm 以上に大きな吸収ピークを示していることが確認できた。Acetal-PEO-OH (比較例) で処理した金粒子は、未修飾の金粒子の UV スペクトルのように 600 nm 以上に大きなピークを持たなかったものの、全体的にピークが高波長側へシフトし多少微粒子分散が不安定化していることが確認された。他方、遠心操作後、pH 3 の水溶液中に再分散させた時も Acetal-PEG-SH のみが非常に安定であり、ベンゼンを用いた凍結乾燥後の再分散性もよいことが確認できた。

(3) PEG 修飾金微粒子の特性 (ゼータ電位)

通常の水溶液分散系では粒子表面を負に荷電させることによりそのチャージ反発により分散安定化させているのに対し、PEG 化金微粒子ではその表面に全くチャージがないことがゼータ電位測定 (大塚電子: ELS8000) により確認された。すなわち、市販の金微粒

子は -34.5 mV であるのに対し、今回作成した金微粒子-ヘテロPEG複合体 (Acetal-PEG-SH/Au) では -0.86 mV となっており、殆ど誤差の範囲で粒子表面にチャージがないといえ、表面がPEG鎖で覆われているものと推測される。

測定データを表1に示す。

表1：アセタール-PEG-SH/金 (Au) 粒子のゼータ電位

サンプル	ゼータ電位 (mV)
未修飾金粒子	-34.5
アセタール-PEG-SH/Au	-0.86 (3回の平均値)

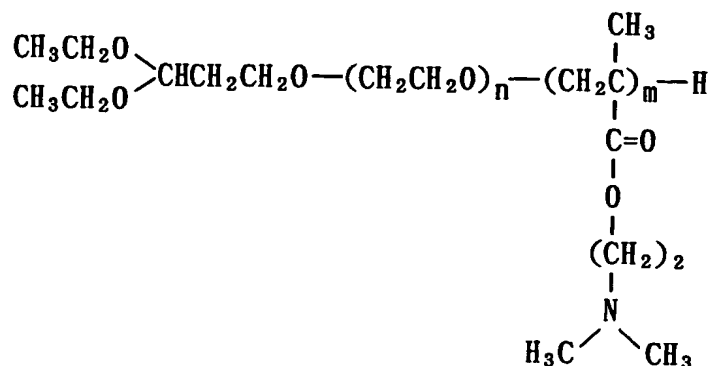
測定溶液：

緩衝剤 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を 10 mM (モル濃度) 加え、そのイオン強度を 0.015 、 pH を 7.5 に調整したリン酸緩衝溶液。

測定機器：ELS-8000 (大塚電子)

製造例3：PEG修飾金微粒子の製造法 (その3)：

この例では、使用ポリマー (Acetal-PEG-PAMA)：



(上述の Kataoka et al., *Macromolecules*, 1999, 32, 6892-6894 に記載の方法に従って得られた。PEG Mw=5000 g/mol、PAMA (ポリ[(2-N,N-ジメチルアミノ)エチルメタクリレート]) の $n=130$ 、 $m=100$) を用いポリエチレング
5 リコール化 CdS 半導体微粒子を作成した。2.5 mg/mL の塩化金酸 (HAuCl_4) 水溶液 1 mL と、6 mg/mL のアセタール-PEG/PAMA ブロック共重合体水溶液 5 mL ($\text{NH}:\text{Au}=8:1$) を混ぜ室温で 24 時間攪拌した。所定時間ごとに UV-vis スペクトルを測定したところ、金微粒子に由来する 540 nm のピークが次第に上
10 昇し、還元剤を加えない状態で金コロイド粒子 (微粒子) 分散体が生成していることが確認された。この溶液を光散乱により測定 (DLS: 動的光散乱) したところ、平均粒径 12 nm の単分散コロイド粒子が生成していることが確認された。

さらに、透過型電子顕微鏡によって、完全に均一な粒子が生成していることが確認された。この溶液を $\text{pH}=2\sim10$ の範囲で変化させ、1
15 日放置しても全くスペクトルに変化は見られず、この系で極めて安定な金コロイド粒子 (微粒子) が得られたことが確認された。

この溶液にブロック共重合体の 10 倍当量の 1,2-ジアミノ-4,5-ジメトキシ 2 塩酸塩 (DDB) を添加し、NaCl によって pH を 2.
20 45 に調整した。溶液を分画分子量 500 の透析膜にて透析し、励起波長 269 nm で蛍光測定した結果、410 nm に強い蛍光を示した。この結果より、調整された金粒子表面に Acetal-PEG/PAMA ブロック共重合体の末端アセタール基がアルデヒド基に変換され、DDB と効率的に反応していることが確認された。こうして形成したアルデヒド基

を介して各種の機能性部分をもたらすことができる。

製造例 4 : P E G 修飾半導体微粒子の製造 :

蒸留水 80 mL 中に上述の Acetal-P E G / P A M A ブロック ($4.19 \times 10^{-7} \text{mol}$)、 CdCl_2 ($6 \times 10^{-6} \text{mol}$) 及び $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ($6 \times 10^{-6} \text{mol}$) を加え、攪拌機 (750 rpm) で 20 分間攪拌した。得られた P E G 修飾半導体 (C d S) 微粒子 (粒径 4 nm) を励起波長 300 nm にて蛍光を測定したところ C d S 微粒子特有の強い蛍光が現れた。

実施例 1 : P E G 修飾微粒子のセンサーチップ表面への固定化 :

10 (1) センサーチップ表面の調製

N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (S P D P) と S P D P のジスルフィド結合還元剤であるジチオスレイトール (D T T) をそれぞれ 1 mM、2 mM となるように混合したエタノール溶液をセンサーチップの金表面に 2 時間反応させた。その後、洗
15 浄した金表面をこの溶液に 30 分浸漬させ、さらに、 0.1mg/mL ストレプトアビジン P B S 溶液 (pH 6.4) を 20 分間流すことで、金表面のストレプトアビジン化を行った。

(2) 製造例 2 に従って得られた P E G (Acetal-P E G-SH) 修飾金微粒子を調製後、pH 2 に金微粒子溶液を調整し、2 時間アセター
20 ル基の脱保護を行い、アルデヒド基に変換した。溶液を pH 6 に調整し、P E G に対して 4 倍量のビオシチンヒドラジドを添加し、6 時間攪拌しながら反応させた (ここで、P E G に対して 4 倍量とは、金微粒子の表面積を粒径から算出し、P E G の表面密度を $0.25 \sim 0.40 \text{本/nm}^2$ と仮定した。この値は微粒子の個数から P E G の本数を算出した値で

ある。通例表面密度は0.25を使っている。0.25の値はPEG化金
微粒子のTgから算出したものである）。その後、NaBH₄を加え3
日間攪拌した。遠心精製後、10mM-PBS（pH6.4）を溶媒置
換溶液を調製した。こうして得られたビオチニル化されたPEG修飾金
5 微粒子溶液に（1）で調製した金表面を有するチップを浸漬すること
により、該表面にPEG修飾金微粒子が固定された。

（3） 表面の特性

（2）で調製されたPEG修飾金微粒子固定化表面を0.1mg/m
1 ウシ血清アルブミン（BSA）PBS溶液（pH6.4）に1時間浸
10 漬させ、表面への吸着量をSPRにより測定した。その結果、未処理の
金表面に対するBSA吸着はSPR角度変化より $\Delta\theta = 0.21^\circ$ であっ
たが、PEG修飾金微粒子固定化表面においては、 $\Delta\theta = 0.02^\circ$ で
あった。これらのデータは、PEG修飾金微粒子固定化表面は血液中の
タンパク質BSAの、非特異的吸着を抑制することを示す

15 実施例2：PEG修飾金ナノ粒子を利用したSPRによるアッセイ

以下常にSPRの流速は常に10 μ L/minであり、設定温度は2
5℃である。またバッファはすべて0.22 μ mフィルターを通した
後、脱気したものを用いた。また、別の流路はレクチンを固定化してい
ないコントロールの流路とした。また、センサーチップ表面のレクチン
20 に結合した金ナノ粒子をすべて解離させる再生溶液には、100mg/
mLのガラクトースを含むバッファを用いた。

A) センサーチップへのレクチンの固定化

実験方法と結果

SPRセンサーチップ（CM5：BIACOREより入手。）を挿入

して、りん酸緩衝溶液 (pH 7.4, 10, 15) を SPR の流路に安定するまで流した。次に EDC (N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩) と NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) の 1 : 1 混合溶液を 100 μ L インジェクトし、チップ上のカルボキシル基を活性化させた。続けて RCA₁₂₀ (50 μ g/mL、溶媒は pH 5.0 の酢酸緩衝溶液) を インジェクトして固定化させ、最後に 1 M エタノールアミド塩酸塩) を 70 μ L インジェクトして、残った活性化 NHS 基をブロッキングした。この時の RU と最初の RU の差により、レクチン固定量は 5600 RU (~ 5.6 ng/mm² = 2.8×10^{-2} レクチン nm²) となった。

B) 1ac65 とレクチンの特異的結合の確認 (1ac65 とは金ナノ粒子 (PEG520 本) 上の PEG の末端の 65 % にラクトースを有するサンプル)

実験方法

40 μ g/mL の 1ac65 を 1800 秒間 (300 μ L) インジェクトすることで、センサーチップ表面のレクチンと金ナノ粒子の結合を測定した。その後バッファーを 3000 秒間流すことにより、金ナノ粒子の解離を測定し、最後に 100 mg/mL のガラクトースをインジェクトすることでセンサーチップを再生した。

20 結果と考察

図 2 に 1ac65 のセンサーグラムを示す。同じ濃度のフリーのラクトース-PEG-S-S-PEG-ラクトースはほとんど RU の増加がなかったのに対して、1ac65 は 5200 RU の増加が得られた。また、ラクトースを表面に有するミセルの系と比較すると、7000 RU

のレクチンが結合しているセンサーチップ上に $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ のミセルをインジェクトすると $\sim 1400 \text{ RU}$ のレスポンスが得られているが、本実験で用いた金ナノ粒子の粒径はこのミセルと同じくらいであるが、
10分の1濃度で4倍のレスポンスが得られたことから、金ナノ粒子によりレスポンスが大きく上昇したと言える。このように大きなレスポンスが得られた理由としては、一つは金ナノ粒子の比重が非常に大きい
ため、チップ表面の誘電率が大きく上昇したことと、チップの金基板と金ナノ粒子との表面プラズモンどうしの相互作用とが挙げられる。

次にバッファーを流したときの解離についてであるが、バッファーを流してもほとんど解離しなかった。そのため、金ナノ粒子とレクチン結合は非常に強いものだと考えられる。

また、1 a c 0 は結合が確認されなかったのに対して、1 a c 6 5 は結合が確認されたことと、ガラクトースを添加することにより、大きくレスポンスの減少、つまり金ナノ粒子の解離が確認されたことから、金ナノ粒子表層のラクトースと R C A 1 2 0 レクチンとの特異的結合が示唆された。

C) 結合におけるリガンド密度の効果

実験方法

ラクトース密度 0 ~ 6 5 % の金ナノ粒子 (1 a c 0、1 a c 1 0、1 a c 2 0、1 a c 3 0、1 a c 4 0、1 a c 5 0、1 a c 6 5) をそれぞれ 4 0、1 0、1、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 3 0 0 μL インジェクトし、その結合量を測定した。

結果と考察

まず、1 a c 0 - 1 a c 6 5 における濃度とレスポンスの関係を図 3

(a) に示す。ここから、ラクトース密度が大きいほど、また濃度が大きいほどRUは増加するという結果が得られた。また、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でインジェクトしたときのlac0-lac65までのセンサーグラムを図3(b)に、リガンド密度と結合量(RU)との関係を図3(c)に示す。これらの結果から、lac10はほとんどレクチンとラクトースは結合せず、lac20は少し結合が確認され、さらにそれ以上ではリガンド密度の増加に伴い、結合が促進するということになり、これはUVの結果とほぼ一致する。UVの実験の考察では、臨界値が20%の理由として、1) レクチンが過剰に溶液中に存在するために粒子がレクチンによりキャッピングされる、2) スペクトルの変化として表面プラズモンを検出するにはある程度以上の金ナノ粒子の凝集が必要である、3) 多価結合の三つの理由を考えていたが、SPRではキャッピングは起こらないし、UVの時のように表面プラズモンのスペクトル変化を見ているわけでもないので臨界値の理由は多価結合が考えられる。

15 具体的には、リガンド密度が大きいと多数のリガンドとレクチンが結合して、強固な結合を生じるが、小さいリガンド密度では、1対1のリガンドとレクチンの結合のように少数のリガンドしか結合に関与できないと考えられる。

D) 解離におけるリガンド密度の効果

20 実験方法

ラクトース密度30-65%の金ナノ粒子(lac30、lac40、lac50、lac65) $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ をそれぞれ数 $10 \mu\text{L}$ インジェクトし、約400RU金ナノ粒子を結合させた。その後、ガラクトース0.1、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含むバッファーをインジェクトし、各ガラクト

ース濃度での解離量を測定した。

結果と考察

図4 (a) にガラクトース $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ をインジェクトしたときのセンサーグラムを示す。ここでは $1ac30$ 、 $1ac40$ は時間がたつにつれて徐々に解離していくのが確認されたが、 $1ac65$ 、 $1ac50$ はほとんど解離が確認されなかったもので、リガンド密度と解離量との関係を図4 (b) に示した。ここから40%と50%の間に顕著な差が見られた。すなわち、 $1ac30$ 、 $1ac40$ の解離量に比べて、 $1ac50$ 、 $1ac65$ の解離量はかなり少なかった。これはUVの実験
10 においてもNIAの増加に40%と50%の間で大きな差があったことと関連があると考えられる。恐らく、このリガンド密度で多価結合の価数に変化があったのではないかと推測される。

また、解離によって高感度に検出することを考えると、リガンド密度が30%以下ならば、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下まで検出できるということ
15 も示された。これに対して50%以上ならば、検出限界はそれ以上の濃度となり、解離においてはリガンド密度がある程度低い方がより高感度に検出できることになり、リガンド密度の効果を詳細に調べることによって、このような応用も考えることができる。

製造例5：非結合末端アミノ化粒子の製造

20 市販の金微粒子溶液 (5 nm) に対して 5×10^4 倍量の acetal-PEG-SH に還元剤として NaBH_4 を加え、1時間反応させた後、金微粒子溶液と同じ $\text{pH} = 6.5$ に調整したものを金微粒子溶液と混合し、1時間攪拌反応させた。HO-PEG-OHを $1 \text{mg}/\text{ml}$ 加え、ウォーターバス 75°C に保ち2時間反応させた。この安定化金コロイド溶液

(金微粒子粒径：5 nm、PEG 4500) を遠心分離（4℃、350000×g、40分）することで余剰ポリマーを除去した後、HClを用いてpH 2に調整し、アセタール基の脱保護を行った（2時間）。脱保護後、NaOHを用いてpH 6に調整し、下記の表2に示すような条件で酢酸アンモニウムを加え3時間反応させた。3時間後PEGに対してそれぞれ還元剤を加え攪拌した。24時間後、遠心精製（4℃、350000×g、30分）を行い、超純水に再分散させた。末端アミノ化の確認としてζ電位の測定を行った。

表2：アミノ化反応の条件

試行 (RUN)	酢酸アンモニウム 添加量	還元剤の種類	還元剤添加方法
1	10mg/ml	トリアセレート	PEGの10倍量を2時間置きに3回添加した後、1日攪拌
2	10mg/ml	水素化ホウ素ナトリウム	PEGの10倍量を添加した後、1日攪拌

測定結果を図5に示す。図から、低pHでのゼータ電位がプラスになり、アミノ化が確認された。

実施例3：金ナノ粒子をSPRチップ表面に直接固定化し、PEG末端をビオチン化する方法

オゾン洗浄した金チップ（オゾン洗浄機で15分）を用意した。これを、別に、用意したアミノ基を有するPEG化金ナノ粒子（PEG 4500粒径5 nm、 $0.76 \times 10^{-10} \text{ mol/mL}$ ）を含むPEG-OH

(2000) 1 mg/ml に浸漬 (一晚) した (サンプル 1)。

BiaCore 3000 に装着し、スルホスクシンイミジルD-ビオチン (0.1 mg/ml 流速 20 μ l/分) を 10 分間流し PEG 末端アミノ基のビオチン化を行った (サンプル 2)。次いで、無水酢酸 10
5 % 水溶液 (流速 10 μ l/分) を 20 分間流し、未反応アミノ基のアセチル化を行った (サンプル 3)。このようにして調製した SPR センサーチップ表面に対してタンパク吸着試験を行った。

実施例 4 : SPR センサーチップ表面に SPDP にて活性エステルを導入し、アミノ基を有する PEG 化金ナノ粒子を固定化する方

10 法

オゾン洗浄した金チップ (オゾン洗浄機で 15 分) を用意した。これを 1 mM SPDP および 2 mM DTT 含有エタノール溶液に 30 分間浸漬した。

さらに別に、用意したアミノ化金ナノ粒子 (PEG 4500 粒径 5 n
15 m、 0.76×10^{-10} mol/ml) を含む PEG-OH (2000) 1 mg/ml に浸漬 (一晚) した (サンプル 4)。

BiaCore 3000 に装着し、スルホスクシンイミジルD-ビオチン (0.1 mg/ml 流速 20 ml/分) を 10 分間流し PEG 末端アミノ基のビオチン化を行った (サンプル 5)。次いで、無水酢酸 10
20 % 水溶液 (流速 10 μ l/分) を 20 分間流し、未反応アミノ基のアセチル化を行った (サンプル 6)。このようにして調製した SPR センサーチップ表面に対してタンパク吸着試験を行った。

結果を図 6 に示す。図 6 中の Run 1 はサンプル 1 を用いた結果、Run 2 はサンプル 1 の代わりに acetal-PEG 金ナノ粒子を用いた結

果、Run 3はサンプル4を用いた結果、Run 4はサンプル4の代わりに acetal-PEG金ナノ粒子を用いた結果を示す。図6より、アミノ基を有するPEG化金ナノ粒子のSPRセンサーチップ表面への担持量が多いことがわかる。

- 5 また、各表面調製における各段階でのレスポンス変化の様子を下記の表3に示す。

表3：各手順段階でのレスポンス変化の様子

	直接吸着による 固定化 1 - (1) ($\times 10^{-40}$)	SPDPによる 固定化 1 - (2) ($\times 10^{-40}$)
10 SPDPによる変化量	—	2800
金微粒子による変化量	5500	2980
活性エステルビオチン による変化量	397	949
15 無水酢酸による変化量	390	158

金チップ表面に直接アミノ化金微粒子を浸漬させ調製した直接吸着による表面(1)において特異・非特異吸着を観察した結果を図7に示す。図7中、一番上の線はストレプトアビジン、中間の線はBSA(アミノ
20 基残余状態)、一番下の線はBSAの吸着を、棒グラフは左から順にサンプル1にストレプトアビジンを、サンプル2にBSAを、そしてサンプル3にBSAを吸着させる試験の結果である。

他方、金チップ表面にSPDPを利用してアミノ化金微粒子を固定化した表面(2)において特異・非特異吸着を観察した結果を図8に示す。

図 7 および図 8 から、図 8 の S P D P で固定化した表面 (2) においてストレプトアビジンとの特異的吸着がより多く観察されていることがわかる。これまで調製してきたビオチン化金微粒子を用いた表面ではストレプトアビジンと B S A の吸着を観察しても特異・非特異と言えるような大きな差異が観察されなかったのに対し、図 8 では $2500 (\times 10^{-40})$ と $9 (\times 10^{-40})$ という大きな差異を確認することができる。

産業上の利用可能性

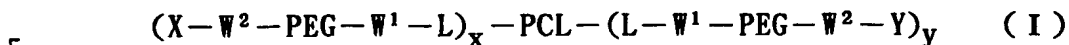
本発明に従えば、生物学的流体中の被検体を検出するに際し、夾雑タンパク質等の非特異的吸着を抑制した上、高感度を有するバイオアッセイのセンサー系が提供される。したがって、各種診断機器の製造業、また、診断業で本発明は利用できる。

15

20

請 求 の 範 囲

1. (A) 構造式 I :



式中、PCLは自由電子金属微粒子、金属酸化物微粒子または半導体微粒子を表し、

Xはバイオセンサーチップ表面に結合することのできる官能基もしくは機能性部分を表し、

10 YはC₁-C₆アルキル基、Xの官能基もしくは機能性部分を形成するのに使用できる保護されていてもよい官能基およびXと同一もしくは異なる機能性部分からなる群より選ばれる1種以上の基もしくは部分を表し、
LはPCLに結合する基もしくは結合部分を表し、

W¹およびW²は、単結合または同一もしくは異なる連結基を表し、

15 PEGは、エチレンオキシド単位：(—CH₂CH₂O—)_n（ここで、nは5-10,000のいずれかの整数である。）を表し、

ここで、(X-W²-PEG-W¹-L)_xと(L-W¹-PEG-W²-Y)_yにおけるW²-PEG-W¹-Lは同一もしくは異なることができ、そして

20 xおよびyは、独立して1以上の整数であり、かつ、一緒になってPEG鎖が水性媒体中でPCLの表面を被覆するのに十分な整数を表すのポリエチレングリコール修飾ナノ粒子と、

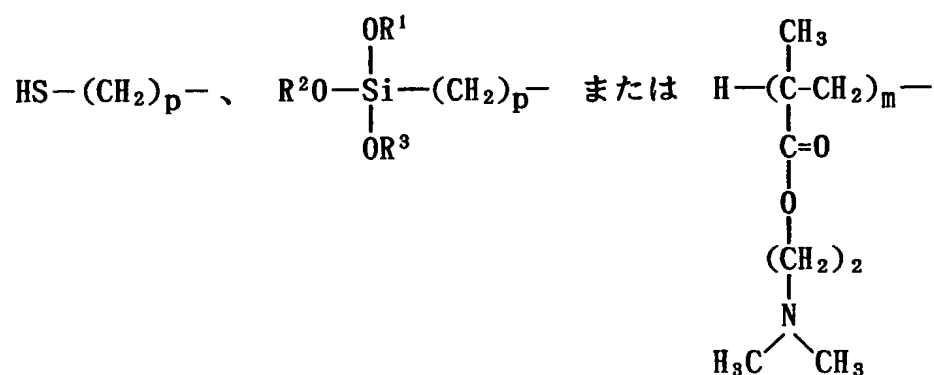
(B) (A)の粒子がXを介して結合することができ、かつガラスまたはPCLの材料に担当する材料からなる表面を有するバイオセンサー

チップとのセットを含んでなるバイオアッセイに用いるためのバイオセンサー系。

2. (A) の粒子と (B) のバイオセンサーチップ表面が X を介して結合することにより、(A) の粒子が (B) のバイオセンサーチップの
5 一つの表面の一部領域もしくは全領域を実質的に被覆するように担持された請求項 1 記載のバイオセンサー系。

3. (A) の粒子と (B) のバイオセンサーチップ表面が、相互に結合されうるか、または水性媒体中で被検体の競合作用により被検体により置換されるように結合した状態で使用されるものである請求項 1 記載
10 のバイオセンサー系。

4. 構造式 I における -L- が



15

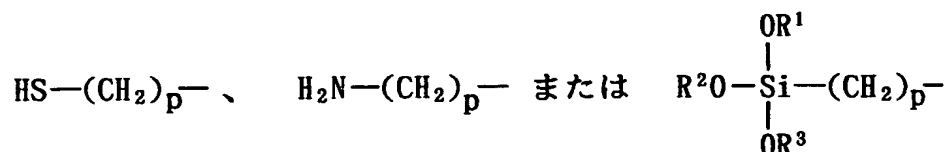
(ここで、p は独立して 2 - 12 のいずれかの整数を表し、R¹、R² および R³ は独立して C₁ - C₈ アルキル基を表し、そして m は 2 - 100
20 のいずれかの整数を表す) の基を表し、

W¹ および W² が独立して、単結合、C₁ - C₈ アルキレン、-COO-
(酸素原子を介してエチレンオキシド単位のメチレン基に結合する)、
-O-、-S-、-(C₁ - C₈ アルキレン)-COO-、-(C₁ - C₈ ア

ルキレン)－O－および－(C₁－C₆アルキレン)－S－からなる群より
 選ばれる基を表す、請求項1記載のバイオセンサー系。

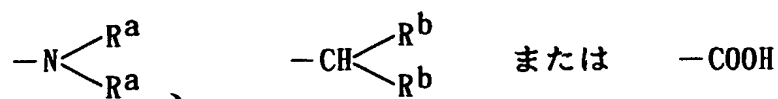
- 5 5. (A)の粒子における構造式IのXが生物学的な特異的結合対を
 形成する一員の残基であり、(B)のセンサーチップが構造式IのPCL
 Lを形成する材料に対応する材料製の薄膜表面を有しており、そして該
 表面にXの生物学的な特異的結合対を形成する一員に対する他の一員が
 直接または少なくともC₁－C₆アルキレン基もしくは(－CH₂CH₂O
 －)_n (ここで、nは5－10,000のいずれかの整数である)を介し
 て担持されている、請求項1記載のバイオセンサー系。

- 10 6. (A)の粒子における構造式IのXが



- 15 (ここで、pは独立して2－12のいずれかの整数を表し、R¹、R²お
 よびR³は独立してC₁－C₆アルキルを表す)の基を表し、(B)のセ
 ンサーチップが構造式IのPCLを形成する材料のいずれかから製造さ
 れた薄膜表面か、またはガラス表面を有しており、そして、(A)の粒
 子と(B)の表面がXの官能基を介して結合しており、但し、(B)の
 表面がガラス製である場合にはXがトリアルコキシシリルを有する、請
 20 求項1記載のバイオセンサー系。

7. (A)の粒子の構造式IにおけるYが式

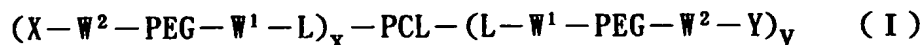


(ここで、 R^a は独立して、水素原子または C_1-C_6 アルキルを表し、 R^b は独立して C_1-C_6 アルキルオキシまたは2つの R^b が一緒になってオキシもしくは C_1-C_6 アルキルで置換されていてもよいエチレン基を形成する原子団を表す)の基である請求項5記載のバイオセンサー系。

- 5 8. (A)の粒子の構造式(I)における $x+y$ が 1 nm^2 当たり0.1-0.5に相当するいずれかの整数である請求項1記載バイオセンサー系。

9. (A)の粒子中のPCLが5~500nmの平均横断面の長さを有する請求項1記載のバイオセンサー系。

- 10 10. 構造式I:



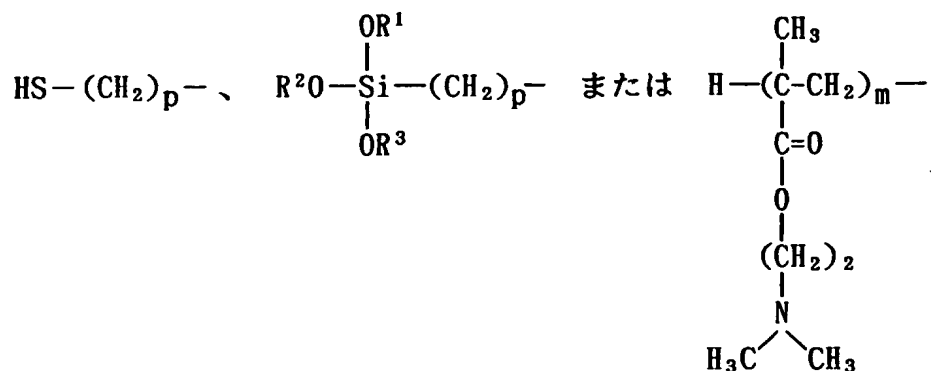
式中、PCLは自由電子金属微粒子、金属酸化物微粒子または半導体微粒子を表し、

- 15 Xはバイオセンサーチップ表面に結合することのできる官能基もしくは機能性部分を表し、
 Yは C_1-C_6 アルキル基、Xの官能基もしくは機能性部分を形成するのに使用できる保護されていてもよい官能基およびXと同一もしくは異なる機能性部分からなる群より選ばれる1種以上の基もしくは部分を表し、
 20 LはPCLに結合する基もしくは結合部分を表し、
 W^1 および W^2 は、単結合または同一もしくは異なる連結基を表し、
 PEGは、エチレンオキシド単位： $(-CH_2CH_2O-)_n$ (ここで、 n は5-10,000のいずれかの整数である。)を表し、
 ここで、 $(X-W^2-PEG-W^1-L)_x$ と $(L-W^1-PEG-W^2-Y)_y$,

における $W^2-PEG-W^1-L$ は同一もしくは異なることができ、 X が生物学的な特異的結合対を形成する一員の残基であり、 Y が生物学的な特異的結合対を形成する残基以外の基であり、

L は、式

5



10

(ここで、 p は 2 - 12 のいずれかの整数を表し、 R^1 、 R^2 および R^3 は独立して $C_1 - C_6$ アルキル基を表し、そして m は 2 - 100 のいずれかの整数を表す) の基を表し、

15 そして $x + y$ は PCL の表面 1 nm^2 当たり 0.1 - 0.5 に相当するいずれかの数であり、 $(x / x + y) \times 100$ が 1 - 99 の整数であり、そして PCL の横断面の平均寸法が 5 - 500 nm であるポリエチレングリコール修飾ナノ粒子。

20 11. X の生物学的な特異的結合対を形成する一員が単糖もしくはオリゴ糖、抗原もしくはハプテン、基質、ホルモンおよびオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれる物質由来の残基である請求項 10 記載のポリエチレングリコール化ナノ粒子。

12. (a) 請求項 10 記載のポリエチレングリコール修飾ナノ粒子を用意し、

(b) 該ナノ粒子のPCLの材料に対応する薄膜表面を有し、該ナノ粒子のXの生物学的な特異的結合対の一員に対する他の一員が直接または少なくともC₁-C₆アルキレン基もしくは(-CH₂CH₂O)_n (ここで、nは5-10,000のいずれかの整数である)を介して担持さ

5 れ表面を有するバイオセンサーチップを用意し、

(c) (a)の粒子および(b)のバイオセンサーチップを該生物学的な特異的結合を形成しうる構成員のいずれかの一員を被検体として含むことが疑われる生物学的流体と接触させ、

(d) 被検体の競合作用による(a)の粒子と(b)のバイオセン
10 サーチップ表面との結合の程度の変化を決定し、

(e) 該変化を生物学的流体中の被検体濃度の指標とする、
ことを含んでなる生物学的流体中の被検体の検出方法。

13. 段階(d)の(a)の粒子と(b)のバイオセンサーチップとの結合の程度の変化が、表面プラズモン共鳴スペクトルの変化により検
15 出される請求項12記載の検出方法。

14. 生物学的な特異的結合対を形成しうる構成員が糖とそれに対するレクチン、抗原もしくはハプテンとそれに対する抗体、基質とそれに対する酵素、ホルモンとそれに対する受容体タンパク質、オリゴヌクレオチドとそれの相補鎖配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌク
20 レオチドからなる群より選ばれる請求項12記載の検出方法。

15. (a)の粒子と(b)のバイオセンサーチップ表面とが生物学的な特異的結合対を形成して予め結合されている請求項12記載の検出方法。

Fig. 1

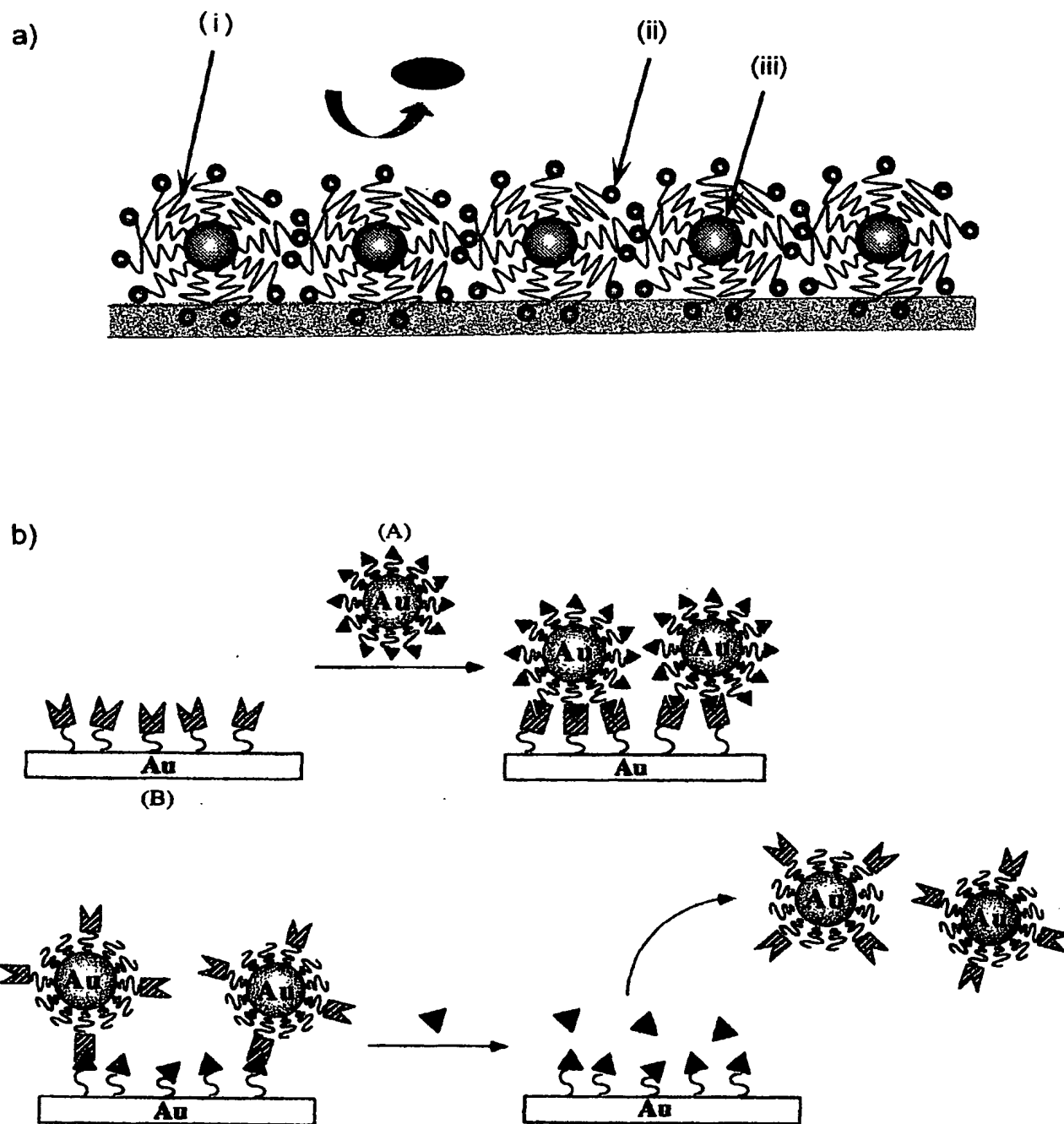


Fig. 2

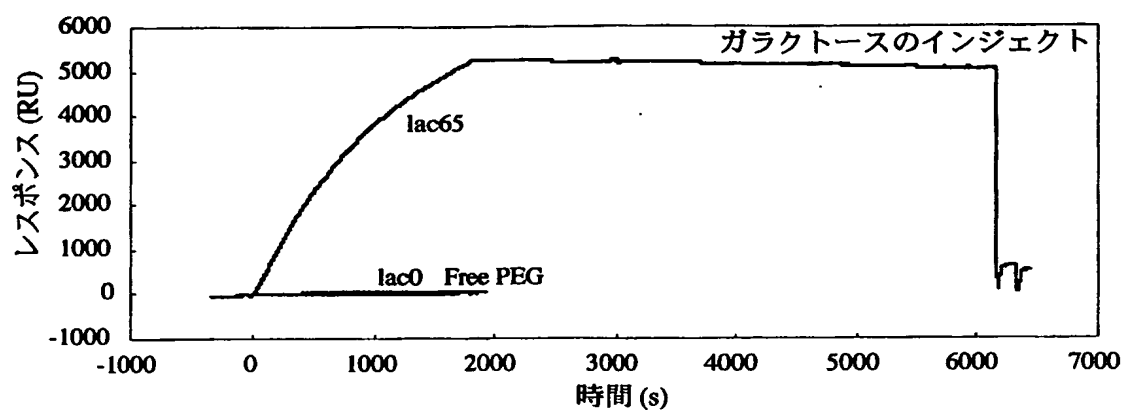


Fig. 3

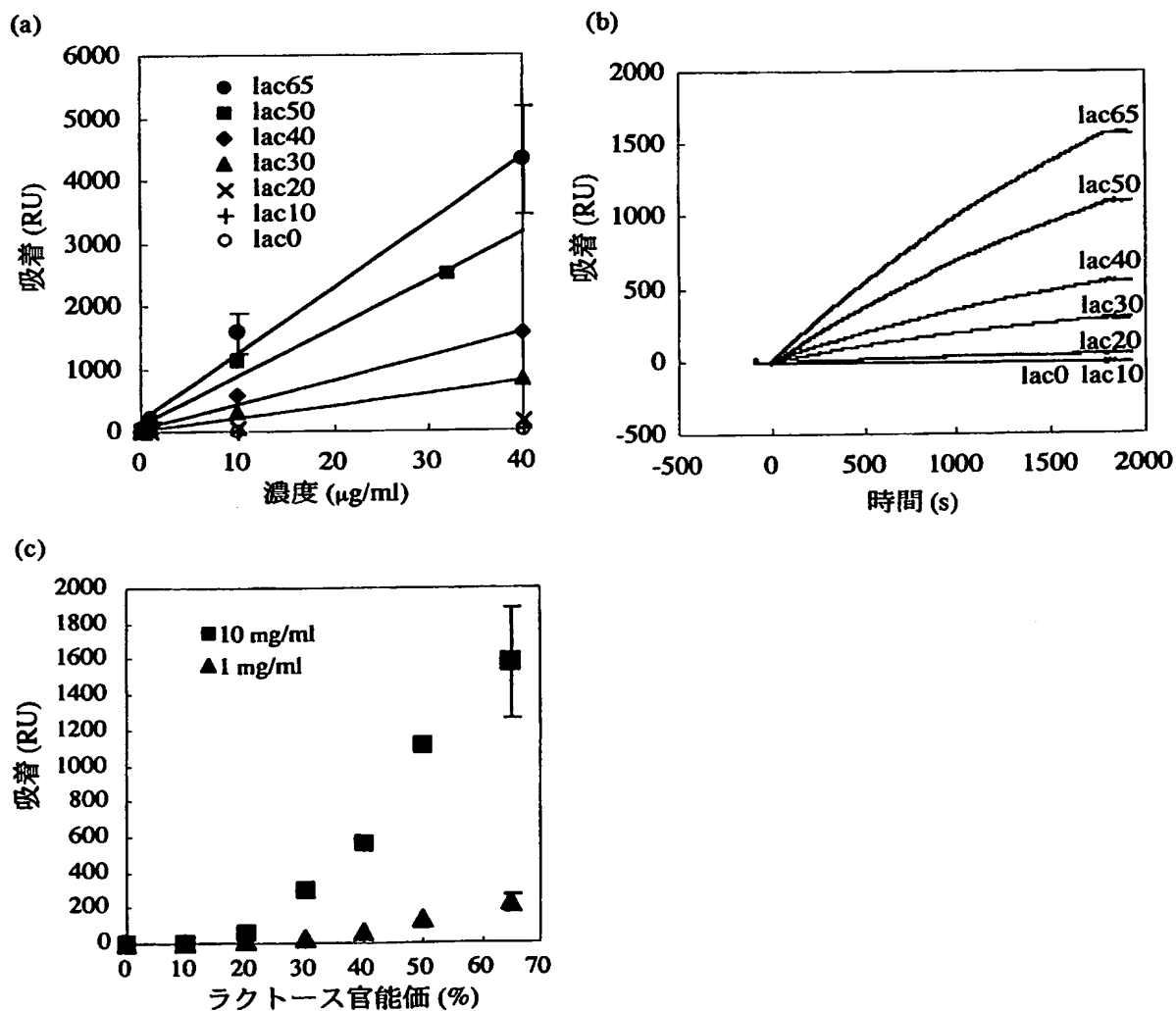


Fig. 4

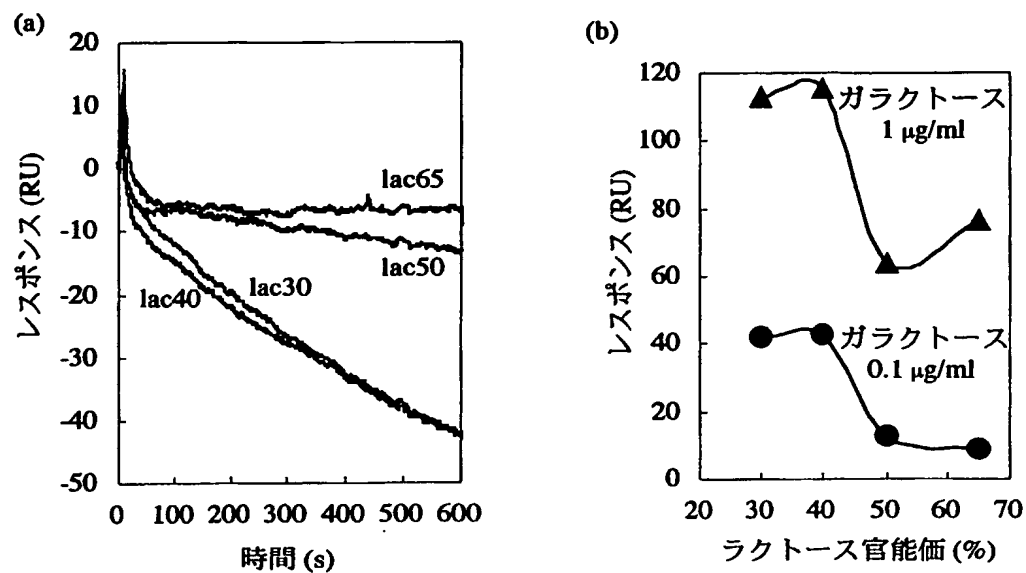


Fig. 5

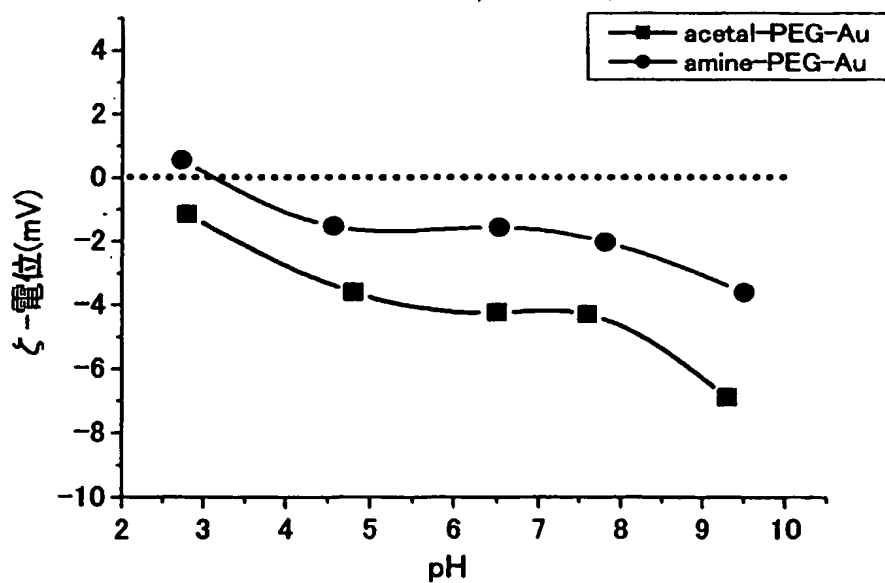


Fig. 6

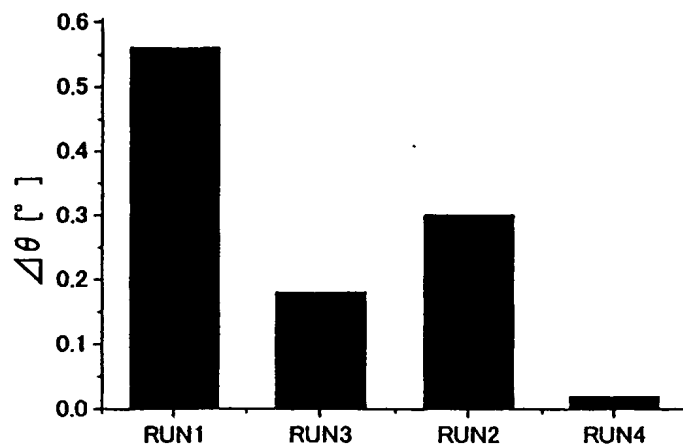


Fig. 7

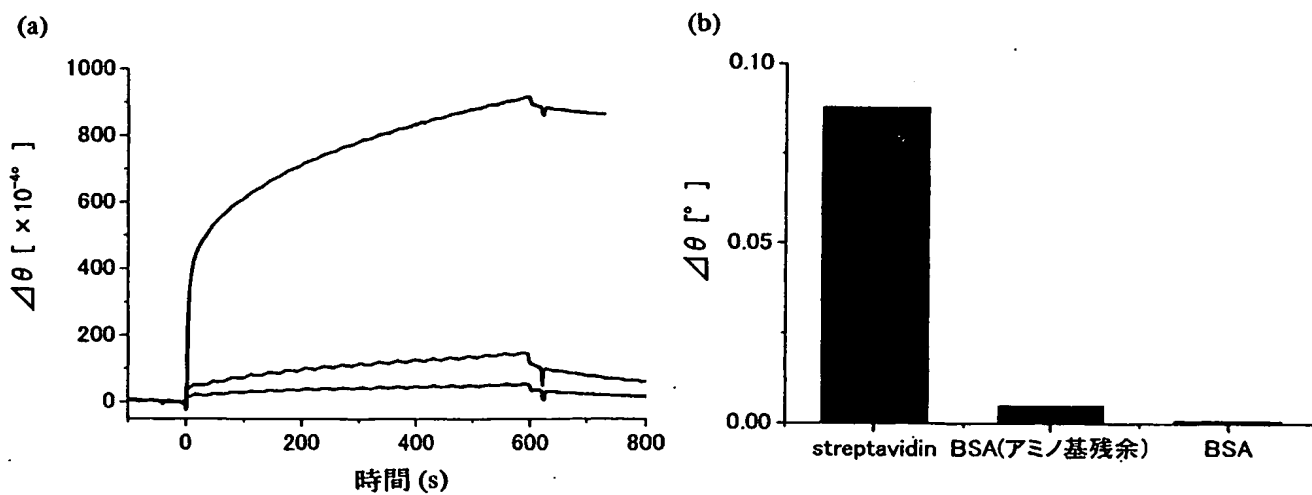
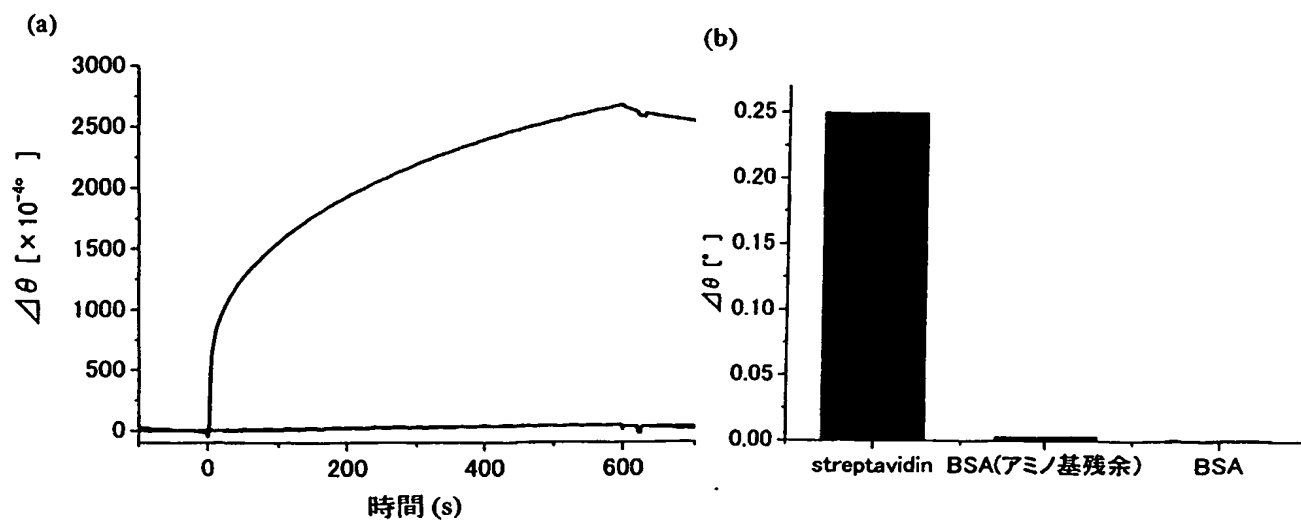


Fig. 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP03/03504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/543, G01N33/545, G01N33/553

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/48-98

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OTSUKA H., "Quantitative and reversible lectin-induced association of gold nanoparticles modified with alpha-lactosyl-omega-mercapto-poly(ethylene glycol)", J.Am.Chem.Soc., 29 August, 2001 (29.08.01), 123(34): 8226-30	1-15
A	WO 02/20200 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 14 March, 2002 (14.03.02), & JP 2002-080903 A	1-15
A	KAKIZAWA et al., "Block Kyojugotai to DNA kara naru Jiko Soshiki-ka Ryushi no Sosei to sono Saibonai DNA Donyu System eno Tenkai", Polymer Preprints, Japan, Vol.50, No.14(2001), pages 3818 to 3819	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
10 April, 2003 (10.04.03)

Date of mailing of the international search report
30 April, 2003 (30.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/03504

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/04918 A (The Government of the United States of America), 17 January, 2002 (17.01.02), & AU 200182904 A	1-15
A	JP 11-140097 A (Boehringer Mannheim GmbH.), 25 May, 1999 (25.05.99), & EP 898170 A	1-15
A	JP 11-211727 A (Boehringer Mannheim GmbH.), 06 August, 1999 (06.08.99), & EP 913690 A & US 2002/0052009 A	1-15
P,A	WO 03/18690 A (Kazunori KATAOKA), 06 March, 2003 (06.03.03), (Family: none)	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/543, G01N33/545, G01N33/553

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/48-98

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	OTSUKA H, "Quantitative and reversible lectin-induced association of gold nanoparticles modified with alpha-lactosyl-omega-mercapto-poly(ethylene glycol)" J Am Chem Soc, 2001 Aug 29;123(34):8226-30	1-15
A	WO 02/20200 A1 (科学技術振興事業団) 2002.03.14 & JP 2002-080903 A	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.04.03

国際調査報告の発送日

30.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子



2 J

9 2 1 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	柿澤他「ブロック共重合体とDNAからなる自己組織化粒子の創製とその細胞内DNA導入システムへの展開」 高分子学会予稿集 第50巻第14号 (2001) 第3818-3819頁	1-15
A	WO 02/04918 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA) 2002.01.17 & AU 200182904 A	1-15
A	JP 11-140097 A (ベーリンガー マンハイム ゲーエムベーハー) 1999.05.25 & EP 898170 A	1-15
A	JP 11-211727 A (ベーリンガー マンハイム ゲーエムベーハー) 1999.08.06 & EP 913690 A & US 2002/0052009 A	1-15
PA	WO 03/18690 A (片岡一則) 2003.03.06 (ファミリーなし)	1-15